

УДК 612/902. 622. 3147

## **Активность водорастворимых катионных порфиринов и их комплексов с церулоплазмином для фотодинамической терапии опухолей *in vitro* и *in vivo***

**А. А. Закоян<sup>1</sup>, Л. В. Мкртчян<sup>1,2</sup>, Н. С. Бабаян<sup>2</sup>,  
Ф. Г. Арсенян<sup>3</sup>, М. Г. Паронян<sup>4</sup>, Т. Е. Сеферян<sup>1</sup>,  
Г. В. Гюльханданян<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА  
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии НАН РА

<sup>3</sup>Институт тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна  
Научно-технологического центра органической и фармацевтической  
химии НАН РА

<sup>4</sup>Научно-производственный центр "Армбиотехнология" НАН РА

**Ключевые слова:** фотосенсибилизаторы, катионные порфирины, церулоплазмин, противоопухолевая активность, цитотоксическая активность, фотодинамическая активность

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является одним из перспективных методов лечения онкологических заболеваний. ФДТ осуществляется при наличии 3 основных факторов: фотосенсибилизатора (ФС), света и кислорода [4]. При введении пациенту ФС может пассивно или активно накапливаться в очаге опухоли и возбуждаться при воздействии света определенной длины волны с образованием активных форм кислорода (АКФ), разрушающих опухоль [11]. Для полной деструкции опухоли и обеспечения эффективности ФДТ требуются высокие уровни генерации АКФ, что сильно зависит от накопления и концентрации ФС в раковых клетках [13]. Идеальный ФС должен обладать химической стабильностью и фотостабильностью, растворимостью в воде, генерировать триплетные состояния, вызывающие флуоресценцию, а также высокой способностью генерации квантового выхода синглетного кислорода  $^1\text{O}_2$  ( $\phi_\Delta$ ). Важно также, чтобы ФС имел высокий молярный коэффициент поглощения ( $\epsilon$ ) в области проникновения света в ткани (красного света) на длинах волн 600–850 нм [17]. Порфирины и металлопорфирины обладают специфическими фотохимическими, фотофизическими и фотоокислительными свойствами, которые регулируются посредством структурных модификаций. Необходимые фотофизические свойства, такие как длина волны

излучения и поглощения в красной области, высокий квантовый выход синглетного кислорода и низкая токсичность *in vivo*, обеспечили их широкое применение в ФДТ опухолей [9]. Ранее нами была исследована цитотоксическая (темновая) и фотодинамическая (световая) противоопухолевая активность большого ряда водорастворимых катионных порфиринов, синтезированных в Армении [8]. Основными переносчиками фотосенсибилизаторов (в том числе и порфиринов) являются белки крови: липопротейны, сывороточный альбумин, гемоглобин [3, 10, 14], трансферрин [5], а также церулоплазмин [6]. Нами были получены комплексы водорастворимых ФС с медьсодержащим гликопротеином крови – церулоплазмином (ЦП) и были исследованы спектральные и флуоресцентные характеристики комплексообразования ФС с ЦП, десорбция ФС при изменении физиологических условий среды (рН и солевой состав среды) [7]. Также было исследовано воздействие света с различной экспозицией (0 – 60 минут) на оптическое поглощение ФС и их комплексов с ЦП [2].

Целью настоящей работы являлось определение эффективных доз водорастворимых катионных порфиринов и их комплексов с ЦП для их противоопухолевой активности в режимах цитотоксического (темнового) и фотодинамического (светового) действия. Эффективность фотосенсибилизаторов, а также полученных комплексов [ЦП+ФС] была изучена на культуре клеток *in vitro* и на животных с перевитой опухолью *in vivo*.

## Материал и методы

### *Водорастворимые катионные порфирины и их комплексы с ЦП.*

В качестве ФС в работе были использованы катионные порфирины и металлопорфирины, синтезированные в Армении (Arm) и Великобритании (UK) в соответствии с методиками работ [12, 15] и предоставленные авторам для экспериментов. ФС были растворены в дистиллированной воде при комнатной температуре. ЦП и комплексы [ЦП + ФС] были получены по методу, ранее описанному в работе [2]. ЦП с индексом чистоты  $I = A_{260} / A_{610} < 20$  в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,35, был выделен из сыворотки крови человека. Комплексы [ЦП+порфирины] были исследованы спектрально (абсорбционная УФ-ВИД спектроскопия). Получены следующие молярные соотношения катионных металлопорфиринов к ЦП: Zn-TBut3PyP (Arm) : ЦП=0,86; Zn-TBut4PyP (Arm) : ЦП=0,46; Zn-TOEt3PyP (Arm) : ЦП=1,73; Zn-TOEt4PyP (Arm) : ЦП = 0,69.

**Клеточные линии.** В работе использовали линии клеток HeLa (карцинома шейки матки) и HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома). Клетки высевали с плотностью  $0,2-0,25 \times 10^6$  клеток/мл в 96-луночные микропланшеты (Greiner, Германия, по 125 мкл на лунку) в полной питательной среде DMEM (Sigma-Aldrich, Германия; для клеточных линий HeLa и

НерG2) или среде RPMI-1640 (Sigma- Aldrich, Германия; для линии клеток НерG2) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, Великобритания), а также 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, Германия), пенициллина 100 МЕ/мл (Sigma-Aldrich, Германия) и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, Германия) и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в темноте в течение 48 ч.

**Оценка *in vitro* цитотоксической (темновой) и фотодинамической (световой) активности порфиринов и их комплексов с церулоплазмином человека.** Определение активности порфиринов и их комплексов с ЦП проводили в микропланшетах с 96 лунками объемом 0,2 мл (Greiner, Германия). Для определения цитотоксической (темновой) активности в лунки добавляли по 12,5 мкл раствора порфирина либо комплексов [ЦП + ФС] и инкубировали с клетками при 37°C в темноте. Для определения фотодинамической (световой) активности через 1 час после добавления растворов порфиринов либо комплексов [ЦП + ФС] микропланшет облучали вольфрамовой лампой мощностью 50 Вт (30 мВт/см<sup>2</sup>) в течение 30 мин. После дальнейшей инкубации в течение 24 часов жизнеспособность клеток оценивали с использованием колориметрического анализа с красителем 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромида (МТТ, Sigma-Aldrich, Германия) [16]. Раствор образца в лунках сливали и в каждую лунку добавляли 50 мкл МТТ (конечная концентрация 0,5 мг/мл). Планшеты осторожно встряхивали и инкубировали в течение 4 часов при 37°C. Супернатант удаляли, в каждую лунку добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, Sigma-Aldrich, Германия) и планшеты осторожно встряхивали для растворения образовавшегося формазана. Результаты оценивали спектрофотометрически с помощью считывателя микропланшетов для ELISA HiPo MPP-96 (Biosan, Великобритания) при длине волны 620 нм. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле: OD экспериментальной группы × 100%/OD контрольной (OD – оптическая плотность клеток). Всего было проведено три независимых эксперимента, каждый из которых включал в себя не менее трех повторов для каждой экспериментальной точки.

**Оценка *in vivo* цитотоксической (темновой) и фотодинамической (световой) противоопухолевой активности порфиринов.** Оценка *in vivo* противоопухолевой активности порфиринов была проведена на модели солидной опухоли саркомы C-180 (Crocker's sarcoma). Для каждой экспериментальной группы использовали 8-10 животных. Самцам белых беспородных мышей в возрасте 6-7 недель, средняя масса от 20 до 25 г, прививали солидную опухоль саркомы C-180 в подмышечную впадину [1]. Шерстный покров животных предварительно депилировали. Выживаемость животных наблюдали в течение 8 дней. Контрольная группа животных оставалась интактной. Для определения цитотоксической (темновой) активности исследуемых препаратов мышам, содержащимся в

условиях темноты, на третьи сутки после приживления опухоли внутрибрюшинно ежедневно вводили раствор ФС (0,3 мг/0,5мл) в течение следующих 3 суток. Контрольные животные получали эквивалентный объем физиологического раствора. Для определения фотодинамической (световой) токсичности исследуемых препаратов, на следующий день после введения последней дозы препарата, опухоль облучали вольфрамовой лампой [50 Вт (30 мВт/см<sup>2</sup>), 20 мин]. Мышей забивали на 8-й день (после приживления опухоли) и определяли массу опухоли по сравнению с контролем. Противоопухолевую активность определяли как торможение роста опухоли (ТРО): [ТРО, %] = [(контроль ТРО – экспериментальная группа ТРО)/контроль ТРО] × 100%.

**Этическая экспертиза.** Биологические эксперименты проводились в полном соответствии с этическими принципами проведения биомедицинских исследований, отраженными в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, одобренных комитетом по биомедицинской этике при Институте биохимии им. Г.Х. Бунятына. Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, Страсбург, № 123, 18.03.1986.

**Статистический анализ** проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad, США). Для сравнения групп применяли U-критерий Манна-Уитни, различия принимали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

**А. Цитотоксическая (темновая) активность порфирина TOEt4PyP (UK) для линии клеток HeLa и HepG2 in vitro.** Проведена оценка цитотоксической (темновой) активности ФС TOEt4PyP (UK) в отношении линий клеток HeLa и HepG2. На рис. 1 показано, что содержание TOEt4PyP (UK) в среде клеток в темновых условиях при различных концентрациях до 100 мкг/мл через 24 ч приводило к снижению жизнеспособности линии клеток HepG2 на  $10,7 \pm 0,54\%$  относительно контроля (светлые столбики 1, 10, 20, 100 мкг/мл), в то время как для линии клеток HeLa наибольшее снижение выживаемости составило  $50,9 \pm 2,55\%$  (темный столбик 100 мкг/мл).

**Б. Цитотоксическая (темновая) и фотодинамическая (световая) активность ЦП человека и его комплексов с порфиринами для линии клеток HeLa in vitro.** Были оценены цитотоксическая (темновая) и фотодинамическая (световая) активность ЦП человека и его комплексов с синтезированными в Армении металлопорфинами Zn-TBut3PyP, Zn-TBut4PyP, Zn-TOEt3PyP, Zn-TOEt4PyP [ЦП + ФС] для линии клеток HeLa.

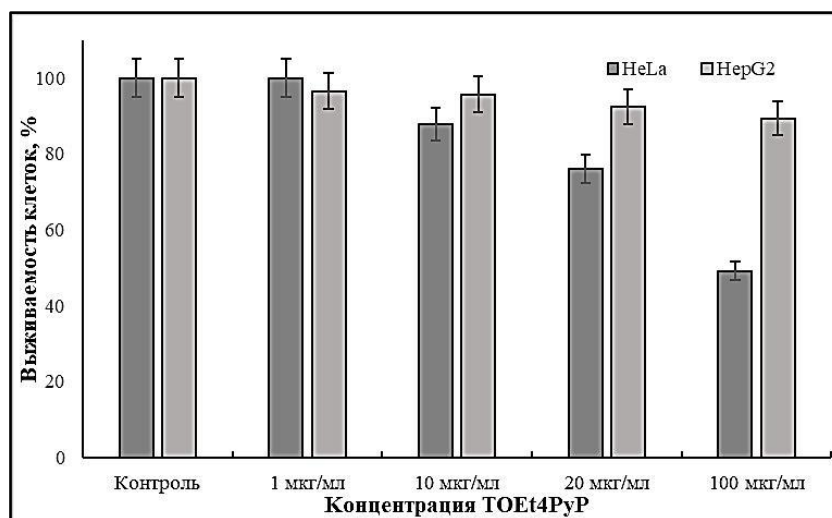


Рис. 1. Выживаемость клеток линий HeLa и HepG2 в темновых условиях при воздействии различными концентрациями порфирина TOEt4PyP (UK). На гистограмме приведены средние значения  $\pm$  SD трех независимых экспериментов;  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

Отметим, что во всех комплексах [ЦП + ФС] концентрация ФС не превышала 10 мкг/мл. На рис. 2 показано, что в среде, содержащей комплекс [CP+Zn-TBut4PyP (Arm)], облучение вольфрамовой лампой 30 мин приводило к наибольшему снижению жизнеспособности линии клеток HeLa относительно контроля (светлый столбик [CP+Zn-TBut4PyP (Arm)]), тогда как облучение клеточной среды, не содержащей ФС, не влияло на

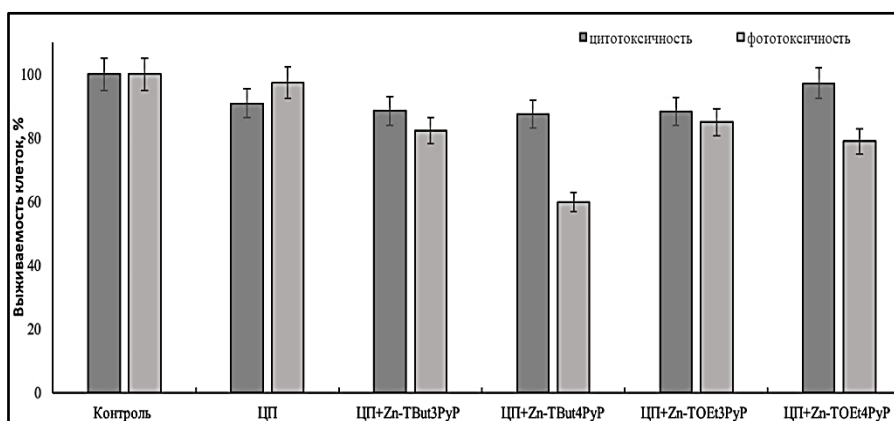


Рис. 2. Цитотоксическая (темновая) и фотодинамическая (световая) активность комплексов порфиринов с ЦП человека [ЦП + ФС] для линии клеток HeLa. На гистограмме приведены средние значения  $\pm$  SD трех независимых экспериментов;  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

выживаемость клеток (светлый столбик [контроль]). Наличие ЦП в среде клеток в концентрации 1,39 мг/мл без облучения вольфрамовой лампой приводило к снижению выживаемости клеток на  $9,1 \pm 0,46\%$  относительно контроля (темный столбик [ЦП]), а при облучении вольфрамовой лампой приводило к снижению выживаемости клеток на  $2,7 \pm 0,14\%$  относительно контроля (светлый столбик [ЦП]).

**В. Цитотоксическая и фотодинамическая активность порфиринов *in vivo*.** Оценены цитотоксическая (темновая) и фотодинамическая (световая) активность ФС  $\text{TOEt4PyP}$  и его цинксодержащего металлопорфирина ( $\text{Zn-TOEt4PyP}$ ) в условиях *in vivo* на модели солидной опухоли саркомы C-180. Результаты представлены на рис. 3. Показано, что при внутрибрюшинном введении ФС  $\text{TOEt4PyP}$  (УК) и  $\text{Zn-TOEt4PyP}$  (УК) с концентрацией 45 мг/кг торможение роста опухоли (ТРО) составило соответственно  $35 \pm 1,8\%$  и  $8 \pm 0,4\%$  (темные столбики  $\text{TOEt4PyP}$  (УК) и  $\text{Zn-TOEt4PyP}$  (УК) относительно контроля). У животных, получивших физиологический раствор при облучении 20 мин, ТРО не происходило (0 %). ФДТ с использованием ФС  $\text{TOEt4PyP}$  (УК) и  $\text{Zn-TOEt4PyP}$  (УК) приводила к уменьшению объема опухоли по сравнению с контрольной группой, при этом ТРО составило соответственно  $50 \pm 2,5\%$  и  $38,5 \pm 1,9\%$  (светлые столбики  $\text{TOEt4PyP}$  (УК) и  $\text{Zn-TOEt4PyP}$  (УК) относительно контроля).

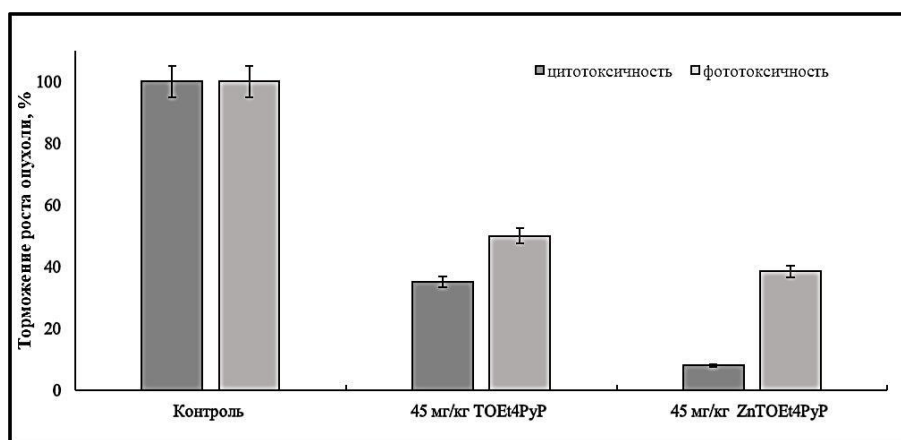


Рис. 3. Цитотоксическая (темновая) и фотодинамическая (световая) активность порфиринов  $\text{TOEt4PyP}$  (УК) и  $\text{Zn-TOEt4PyP}$  (УК) на мышинной модели солидной опухоли саркомы C-180 (Crocker's sarcoma). Гистограмма торможения роста опухоли в течение 8 дней.

На гистограмме приведены средние значения  $\pm$  SD трех независимых экспериментов;  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

## Выводы

- Содержание порфирина TOEt4PyP (UK) в концентрации 100 мкг/мл в среде культуры клеток в темновых условиях через 24 ч вызывало снижение жизнеспособности клеточной линии HepG2 относительно контроля на  $10,7 \pm 0,54\%$ , в то время как для линии клеток HeLa снижение выживаемости составило  $50,9 \pm 2,55\%$ .
- Из всех исследованных комплексов [ЦП + ФС] к наибольшему снижению выживаемости линии клеток HeLa (на  $40,23 \pm 2\%$ ) приводит комплекс [ЦП+Zn-TBut4PyP (Arm)] с концентрацией 4,49 мкг/мл.

Эффективность фототоксичной (световой) дозы порфиринов TOEt4PyP (UK) и Zn-TOEt4PyP (UK) на мышинной модели солидной опухоли саркомы C-180 (Croker's sarcoma) *in vivo* составила 45 мкг/мл.

Поступила 15.01.21

## Զրալույծ կատիոնային պորֆիրինների և ցերուլոպլազմինի հետ դրանց կոմպլեքսների ակտիվությունները *in vitro* և *in vivo* ֆոտոդինամիկ թերապիայի համար

Ա. Ա. Զաքոյան, Լ. Վ. Մկրտչյան, Ն. Ս. Բաբայան, Ֆ. Հ. Արսենյան,  
Մ. Գ. Պարոնյան, Թ. Ե. Սեֆերյան, Գ. Վ. Գյուլիսանդանյան

Ուսումնասիրվել են ջրալույծ կատիոնային պորֆիրինների և մարդու ցերուլոպլազմինի հետ դրանց կոմպլեքսների ցիտոտոքսիկ և ֆոտոդինամիկ ակտիվությունները *in vitro* և *in vivo* պայմաններում, որոշվել են դրանց արդյունավետ չափաքանակները: Ցույց է տրվել, որ միջավայրում TOEt4PyP (UK)-ի պարունակությունը 100 մկգ/մլ կոնցենտրացիայով տոքսիկ չէ HepG2 բջիջների համար, իսկ HeLa բջիջների կենսունակությունը նվազեցնում է  $50,9 \pm 2,55\%$ -ով: Մարդու ցերուլոպլազմինի հետ Zn-TBut3PyP (Arm), Zn-TBut4PyP (Arm), Zn-TOEt3PyP (Arm) և Zn-TOEt4PyP (Arm) մետաղապորֆիրինների կոմպլեքսները, որոնցում պորֆիրինների պարունակությունը չի գերազանցել 10 մկգ/մլ-ը, տոքսիկ չեն HeLa բջիջների համար կուլտուրայում: 4,5 մկգ/մլ կոնցենտրացիայով մետաղապորֆիրին Zn-TBut4PyP-ը (Arm) (ֆոտոդինամիկ ազդեցություն) նվազեցրել է HeLa բջիջների կենսունակությունը կուլտուրայում  $40,23 \pm 2\%$ -ով: Մկան C-180 (Croker's sarcoma) պինդ ուռուցքի մոդելի վրա TOEt4PyP (UK) և Zn-TOEt4PyP (UK) պորֆիրինների *in vivo* արդյունավետ ֆոտոտոքսիկ (լույսային) չափաքանակը կազմել է 45 մկգ/մլ:

## Activity of Water-soluble Cationic Porphyrins and Their Complexes with Ceruloplasmin for Photodynamic Therapy of Tumors *in vitro* and *in vivo*

A. A. Zakoyan, L. V. Mkrtchyan, N. S. Babayan, F. H. Arsenyan,  
M. H. Paronyan, T. E. Seferyan, G. V. Gyulkhandanyan

The study presents the cytotoxic and photodynamic activity of water-soluble cationic porphyrins and their complexes with human ceruloplasmin *in vitro* and *in vivo*, as well as determines their effective doses. It was shown that the porphyrin TOEt4PyP (UK) at concentration of 100 µg/ml under dark conditions in 24 h caused a decrease in the viability of the HepG2 cells by  $10,7 \pm 0,54\%$  of control, while for the HeLa cell line the decrease in survival was  $50,9 \pm 2,55\%$ . Complexes of Zn-TBut3PyP (Arm), Zn-TBut4PyP (Arm), Zn-TOEt3PyP (Arm), and Zn-TOEt4PyP (Arm) metalloporphyrins with human ceruloplasmin at porphyrins concentration less than 10 µg/ml were non-toxic for the HeLa cell line. The photodynamic effect of metalloporphyrin Zn-TBut4PyP (Arm) at concentration of 4.5 µg/ml caused a decrease in viability of HeLa cells by  $40,23 \pm 2\%$ . The *in vivo* effective phototoxic (light) dose of porphyrins TOEt4PyP (UK) and Zn-TOEt4PyP (UK) on solid tumor sarcoma C-180 (Crocker's sarcoma) mouse model was 45 µg/ml.

### Литература

1. Софьина З.П., Сыркин А. Б., Голдин А., Кляйн А. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США, М., 1980.
2. Закоян А. А. Влияние света на оптическое поглощение фотосенсибилизаторов и их комплексов с церулоплазмином человека. Мед.наука Армении НАН РА, 2020, т. LX, 3, с. 62-70,.
3. Cohen S. and Margalit R. Binding of porphyrin to human serum albumin. Biochem J. 270, 325-330, 1990.
4. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q. Photodynamic Therapy. Natl. Cancer Inst., 90(12), 889-905, 1998.
5. Gyulkhandanyan Anna G., Parkhats M. V., Knyukshto V. N., Lepeshkevich S. V., Dzhagarov B. M., Zakoyan A. A., Gyulkhandanyan Aram G., Sheyranyan M. A., Kevorkian G. A., Gyulkhandanyan G. V. Binding of cationic porphyrins and metalloporphyrins to the human transferrin for photodynamic therapy of tumors. Proc. of SPIE, 10685, 1068504-1 - 1068504-9, (2018). doi: 10.1117/12.2306577.
6. Gyulkhandanyan Anna G., Zakoyan A. A., Gyulkhandanyan Aram G., Parkhats M. V., Dzhagarov B. M., Lazareva E. N., Tuchin V. V., Gyulkhandanyan G.V. Ceruloplasmin - a potential carrier of photosensitizers for photodynamic therapy of tumors. Proc. of SPIE, 11079, 110791T-1 - 110791T-3, 2019, doi: 10.1117/12.2527568.
7. Gyulkhandanyan Aram G., Zakoyan A. A., Mkrtchyan L. V., Gyulkhandanyan Anna G., Parkhats M. V., Dzhagarov B. M., Sheyranyan M. A., Simonyan G. M., Lazareva E. N., Tuchin V. V., Gyulkhandanyan G. V. Binding of ceruloplasmin with cationic porphyrins: pH and salt composition of a medium. Proc. of SPIE, 11363, 1136329-1-1136329-9, 1136329 (2 April 2020, Photonics Europe Digital Forum) 2020, <https://doi.org/10.1117/12.2556021>.

8. *Gyulkhandanyan G. V., Ghambaryan S. S., Amelyan G. V., Ghazaryan R. K., Arsenyan F. H., Gyulkhandanyan A. G.* Investigation of photodynamic activity of water-soluble porphyrins in vitro and in vivo. *Proc. of SPIE*, 6139, 613911-1- 613911-7, 2006.
9. *Imran M., Ramzan M., Qureshi A. K., Azhar Khan M., Tariq M.* Emerging Applications of Porphyrins and Metalloporphyrins in Biomedicine and Diagnostic Magnetic Resonance Imaging. *Biosensors*, 8(4), 95, 2018, doi: 10.3390/bios8040095.
10. *Kessel D.* Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Lett.*, 33, 183-188, 1986.
11. *Kruger C. A., Abrahamse H.* Utilisation of Targeted Nanoparticle Photosensitiser Drug Delivery Systems for the Enhancement of Photodyn. Ther., *Molecules*, 23(10), 2628, 2018.
12. *Madakyan V. N., Kazaryan R. K., Khachatryan M. A., Stepanyan A. S., Kurtikyan T. S., Ordyan M. B.* Synthesis of new water-soluble cationic porphyrins. *Khimiya heterociklicheskih soedinenii (Russia)*, 2, 212-216, 1986.
13. *Mokwena M. G., Kruger C. A., Ivan M., Abrahamse H.* A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 22, 147–154, 2018.
14. *Sil S., Bose T., Roy D., and Chakraborti A. S.* Protoporphyrin IX-induced structural and functional changes in human red blood cells, haemoglobin and myoglobin. *J. Biosci.*, 29(3), 101-111, 2004.
15. *Tovmasyan A. G., Ghazaryan R. K., Sahakyan L., Gasparyan G., Babayan N., Gyulkhandanyan G. V.* Synthesis and anticancer activity of new water-soluble cationic metalloporphyrins. *European Conferences on Biomedical Optics*, 2007, Munich, Germany, Technical Abstract Summaries, pp.71-72, 2007.
16. *Van de Loosdrecht A. A., Beelen R. H. J., Ossenkoppele G. J., Broekhoven M. G., and M. M. A. C. Langenhuijsen.* A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J. Immunol. Methods*, vol. 174 (1-2), pp. 311-320, 1994.
17. *Vázquez-Hernández F., Granada-Ramírez D.A., Arias-Cerón J.S., Rodríguez-Fragoso P., Mendoza-Álvarez J.G., Ramón-Gallegos E., Cruz-Orea A., Luna-Arias J.P.* Use of nanostructured materials in drug delivery. [Nanobiomaterials](#), 503-549, 2018.